

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-509467

(43)公表日 平成7年(1995)10月19日

第3部門第2区分

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I
A 61 K 51/00	ADU		
45/00	A B C	8415-4C	
47/48	Z	7433-4C	
		8415-4C	A 61 K 43/00
		9051-4C	ADU
			49/02 B
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 18 頁) 最終頁に続く		

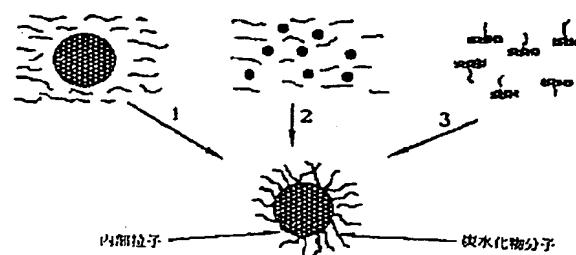
(21)出願番号	特願平6-504662	(71)出願人	ザ ゼネラル ホスピタル コーポレーション
(86) (22)出願日	平成5年(1993)7月21日		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ポストン フルーツ ストリート 55
(85)翻訳文提出日	平成7年(1995)1月20日	(72)発明者	バビゾフ ミカール アイ
(86)国際出願番号	PCT/US93/06848		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ポストン #15 ハウソーン ブレイス 9
(87)国際公開番号	WO94/02068	(72)発明者	ブラディ トーマス ジェイ
(87)国際公開日	平成6年(1994)2月3日		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウィンチエスター ローソン ロード 10
(31)優先権主張番号	917,707	(74)代理人	弁理士 吉田 研二 (外2名)
(32)優先日	1992年7月21日		
(33)優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リンパ組織への薬物輸送システム

(57)【要約】

動物の診断または治療のための物質。物質は、検出可能かまたは治療上活性がある剤を含み、剤がターゲット指向部位に連結されている担体に連結されており、それによって剤がターゲット指向部位が存在しない場合よりも、より大きな度合い動物のリンパ系に蓄積する。



特表平7-509467 (2)

断片に相当できる、請求項1記載の診断または治療物質。

請求の範囲

1. 物質が検出可能かまたは生物活性のある剤を含み、前記剤がターゲット指向部位に連結されている抗体に連結されているか、または当該抗体内部に保持されおり、それによって前記剤が、前記ターゲット指向部位が存在しない場合よりも、より大きな度合い動的リシン系に富むする。
動物の診断または治療のための物質。

2. 前記物質の量が100nm以下である、請求項1記載の診断または治療物質。

3. 前記物質の水和した量が10から30nmである、請求項1記載の診断または治療物質。

4. 前記抗体がポリマーを含む、請求項1記載の診断または治療物質。

5. 前記ポリマーが線状である、請求項4記載の診断または治療物質。

6. 前記ポリマーが非線状である、請求項4記載の診断または治療物質。

7. 前記ポリマーがポリペプチド、多糖類およびそれらの共重合体の群から選択される、請求項4記載の診断または治療物質。

8. 前記ポリマーがポリリシンおよびポリリシン共重合体の群から選択される、請求項4記載の診断または治療物質。

9. 前記ポリマーがシリコンまたはリンを含む、請求項4記載の診断または治療物質。

10. 前記ターゲット指向部位がC3または自然に存在するC3の変異型または

20. 前記官能基がハロゲンである、請求項14記載の診断または治療物質。

21. 前記官能基がキレートかまたはキレート導体である、請求項14記載の診断または治療物質。

22. 前記官能基がN-オキシスクシンイミドエステルである、請求項14記載の診断または治療物質。

23. 前記抗体が粒子を含む、請求項1記載の診断または治療物質。

24. 前記粒子が前記粒子を前記剤に連結するための官能基を含む、請求項23記載の診断または治療物質。

25. 前記粒子が有機の粒子、無機の粒子、およびそれらの組成物の群から選択される、請求項23記載の診断または治療物質。

26. 前記粒子がラテックスを含む、請求項23記載の診断または治療物質。

27. 前記粒子が鉄を含む、請求項23記載の診断または治療物質。

28. 前記物質を1mMクエン酸ナトリウムを含むラット血漿に37℃で2時間さらす場合、前記物質が前記物質の1位子に付き1分子以下のトランスフェリンに結合するように前記ターゲット指向部位が前記物質に分布されている、多数のターゲット指向部位をさらに含む、請求項27記載の診断または治療物質。

29. 0.9%NaCl水溶液中の前記物質の0.01-1.0mg/mlの混合物が、前記物質を前記溶液に加えた後、25℃でインキュベートした場合、インキュベーションの初めの24時間中に凝集または沈殿しない、請求項27記載の

11. 前記ターゲット指向部位が炭水化物を含む、請求項1記載の診断または治療物質。

12. 前記炭水化物がデキストラン、デンプン、β-グルカン、グルコース、フリコール(スクロースの合成ポリマーの商標名)、およびそれらの誘導体および類似体の群から選択される、請求項1記載の診断または治療物質。

13. 前記炭水化物が分子量1から20kDを有する、請求項11記載の診断または治療物質。

14. 前記ポリマーが前記抗体を前記剤に連結するための官能基を含む、請求項4記載の診断または治療物質。

15. 前記官能基がアミノ基かまたはアミノ酸導体である、請求項14記載の診断または治療物質。

16. 前記官能基がカルボキシル基かまたはカルボキシル基導体である、請求項14記載の診断または治療物質。

17. 前記官能基がカルボニル基かまたはカルボニル誘導体である、請求項14記載の診断または治療物質。

18. 前記官能基がチオール基かまたはチオール誘導体である、請求項14記載の診断または治療物質。

19. 前記官能基が芳香族基かまたは芳香族誘導体である、請求項14記載の診断または治療物質。

の診断または治療物質。

30. 0.0.9%NaCl水溶液中の前記物質の0.01-1.0mg/mlの混合物が、前記物質を前記溶液に加えた後、均一の磁場0.47テスラで37℃でインキュベートした場合、インキュベーションの初めの72時間中に凝集または沈殿しない、請求項27記載の診断または治療物質。

31. 前記粒子がシリコンを含む、請求項23記載の診断または治療物質。

32. 前記粒子が放射性同位元素を含む、請求項23記載の診断または治療物質。

33. 前記放射性同位元素がインジウム、チクネチウム、ヨウ素およびガリウムの群から選択される、請求項32記載の診断または治療物質。

34. 前記剤が磁性標識を含む、請求項1記載の診断または治療物質。

35. 前記磁性標識が常磁性または超常磁性標識を含む、請求項34記載の診断または治療物質。

36. 前記磁性標識が鉄、磁化鉄、フェライト、ガドリニウム、マンガン、およびジスプロシウムの群から選択される、請求項34記載の診断または治療物質。

37. 前記剤が液化気共鳴特性を有する安定な同位元素を含む、請求項1記載の診断または治療物質。

38. 前記同位元素がリン、シリコン、およびナトリウムの群から選択される、請求項37記載の診断または治療物質。

39. 前記剤が生物活性のある成分を含む、請求項1記載の診断または治療物質。

特表平7-509467 (3)

質に分布されている多數のターゲット指向部位をさらに含む、請求項1記載の診断または治療物質。

4.0. 前記生物活性のある成分が放射性同位元素を含む、請求項3.9記載の診断または治療物質。

4.1. 前記放射性同位元素がアルファまたはベータ線放射体である、請求項4.0記載の診断または治療物質。

4.2. 同記放射性同位元素がI、Br、およびHの群から選択される、請求項4.0記載の診断または治療物質。

4.3. 前記剤が超常磁性酸化鉄を含む、請求項1記載の診断または治療物質。

4.4. 前記剤がペブチドを含む、請求項1記載の診断または治療物質。

4.5. 前記担体の径が100nm以下である、請求項1記載の診断または治療物質。

4.6. 前記担体の前記水和した径が10-30nmである、請求項1記載の診断または治療物質。

4.7. 前記物質を前記動物に前記動物の1kgの体重に付き1mgの用量で筋肉内注射する場合、リンパ節組織の1gに付き前記物質の注射された用量の少なくとも5%がリンパ節に蓄積するように前記ターゲット指向部位が前記担体に分布されている多くのターゲット指向部位をさらに含む、請求項1記載の診断または治療物質。

4.8. 前記物質を1mMクエン酸ナトリウムを含むラット血液の血漿に37℃で2時間さらず場合、前記物質に吸収されるタンパク質の80%以上がC3か、または自然に存在するその変異型であるように、前記ターゲット指向部位が前記物質に分布する。

5.8. 物質がターゲット指向部位を含む担体を含み、それによって前記担体が前記ターゲット指向部位が存在しない場合よりも、より大きな皮膚動物のリンパ系に蓄積する、動物の診断または治療のための物質。

5.9. 前記物質の径が100nm以下である、請求項5.8記載の診断または治療物質。

5.10. 前記物質の水和した径が10から30nmである、請求項5.8記載の診断または治療物質。

6.1. 前記物質を前記動物に前記動物の1kgの体重に付き1mgの用量で筋肉内注射する場合、リンパ節組織の1gに付き前記物質の注射された用量の少なくとも5%がリンパ節に蓄積するように前記ターゲット指向部位が前記担体に分布されている多くのターゲット指向部位をさらに含む、請求項5.8記載の物質。

6.2. 前記物質を1mMクエン酸ナトリウムを含むラット血液の血漿に37℃で2時間さらず場合、前記物質に吸収されるタンパク質の80%以上がC3か、または自然に存在するその変異型であるように、前記ターゲット指向部位が前記物質に分布されている多數のターゲット指向部位をさらに含む、請求項5.8記載の物質。

6.3. 1mMクエン酸ナトリウムを含むラットの血漿に37℃で2時間さらず場合、前記物質が血液の血漿タンパク質においてその重量の50%以下を吸収するように、前記ターゲット指向部位が前記物質に分布されている多數のターゲット指向部位をさらに含む、請求項5.8記載の物質。

6.4. 前記物質を1mMクエン酸ナトリウムを含むラットの血漿に37℃で2時間さらず場合、前記物質に吸収されるタンパク質の80%以上がC3か、または

4.9. 1mMクエン酸ナトリウムを含むラットの血漿に37℃で2時間さらず場合、前記物質が血液の血漿タンパク質においてその重量の50%以下を吸収するように、前記ターゲット指向部位が前記物質に分布されている多數のターゲット指向部位をさらに含む、請求項1記載の診断または治療物質。

5.0. 前記物質を1mMクエン酸ナトリウムを含むラットの血漿に37℃で2時間さらず場合、前記物質に吸収されるタンパク質の80%以上がC3か、または自然に存在するその変異型であり、前記物質が血液の血漿タンパク質においてその重量の50%以下を吸収するように、前記ターゲット指向部位が前記物質に分布されている多數のターゲット指向部位をさらに含む、請求項1記載の物質。

5.1. ターゲット指向部位を含む担体および剤を供給し、前記剤を前記担体に連結させることを含む、診断または治療物質を調製する方法。

5.2. 前記担体がポリマーである、請求項5.1記載の方法。

5.3. 前記担体が粒子である、請求項5.1記載の方法。

5.4. 前記剤が放射性化合物である、請求項5.1記載の方法。

5.5. 前記剤が造影剤である、請求項5.1記載の方法。

5.6. 前記剤が有機の分子である、請求項5.1記載の方法。

5.7. 請求項1記載の診断または治療物質および医学上許容される化合物を含む、薬剤組成物。

自然に存在するその変異型であり、前記物質が血液の血漿タンパク質においてその重量の50%以下を吸収するように、前記ターゲット指向部位が前記物質に分布されている多數のターゲット指向部位をさらに含む、請求項5.8記載の物質。

特表平7-509467 (4)

明細書

リンパ組織への薬物輸送システム

本発明は、関心のある領域（たとえばリンパ系）へ診断剤および治療剤を輸送するための診断物質または治療物質に関する。

発明の背景

リンパ組織が大部分の病理の過程に関係していることはよく知られている。それらは、周囲の組織における重要な役割を有する。炎症の初期段階が治療の成功に重要な役割を有する。リンパ節の摘出と正確なリンパ節の病理分類が治療の成功に重要な役割を有する。多くの場合において、組織病理学がリンパ節評価の最も正確な方法であるが、このアプローチは手術的処置を必要とし、局所の解剖部位に限定されている。医療画像法における現在の技術はリンパ節の腫瘍関連を評価するためにサイズ基準を用いる。しかしながら、正常のサイズの節が癌を含むことがある。一方腫瘍の節が癌を含まないことがあるのでサイズは不完全な指標である。したがって、リンパ節評価および機能の詳細を選択的に強調する診断の調製物は、主要な最新の診断方法、たとえば、核医学、磁気共鳴画像およびX線コンピュータ連動断層撮影の感度および特異性の両方を改善し得る。同様に、治療の効果は腫瘍を受けた組織における薬物の局所への集中を増大することにより顯著に改善され得る。ヒトの体はリンパ節の数が多く、それらの大部分への接近が困難なので、單一の臓器内注射の後、全てのリンパ節に到達する割合が大きい。

リンパ系の構造は、リンパ管を通過して間質に局在化される調製物の排出により、リンパ管への薬物輸送を可能にする。この経路は末梢リンパ管のリンパ管撮影法および画像化に用いられ、最近、デキストラム分子またはコロイド状の炭素粒子に固定された抗凝剤のような治療調製物の投与が示唆されている。

以前、炭水化物およびそれらの誘導体を含む調製物は、局所投与（間質またはリンパ内）によりリンパ管へ輸送されていた。リンパ系に局所投与された調製物

の作用は、調製物の型に依存する。たとえば、コロイドはリンパ管細胞によりリノバからしばしば吸収されるが、いくつかのポリマーの調製物（たとえばデキストラム）は顕著な吸収なしにリンパ管を介してリンパ管を通り抜ける。臓器内投与の後、多くの組織の調製物の大部分のフラクションはリンパ組織よりもむしろ肝臓および脾臓により吸収される。ポリマーの調製物はリンパ系による、いくつかの吸収を示すが、リンパ管組織におけるそれらの蓄積の不足は、それらをターゲット指向の診断または治療物質としてあまり望ましくないものにしている。したがって、これらの調製物は、生物の容易に接近し易い表面領域に位置するリンパ管の調査には有用なようであるが、接近しにくい領域に位置するリンパ管には有用ではないようである。

臓器内投与の後のリンパ組織における顕著な蓄積が存在しないにもかかわらず、以前の調製物はリンパ管調査のための生物学的モデルに用いられた。金属性ボルフィリンがリンパ管への放射性試験の輸送に用いられているが、リンパ管へ輸送される同位元素の総量は通常約1%を上回らなかった。以前の調製物である極小の酸化鉄粒子の小フラクション（組織1グラムに付き用意の約3.6%）が臓器内投与後、リンパ組織に現われたが、これらの粒子の大部分は肝臓と脾臓に見出されることがWeissleder, R. ら "Ultrasmall Supermagnetic Iron Oxide: Pharmacokinetics and Toxicity" American Journal of Radiology, 1989, Vol. 152, pp. 167-73にも示されている。粒子の最小量だけがリンパ管および他の組織に検出可能だった。酸化鉄粒子は米国特許第4,770,183号および第4,827,945号に記載されているように画像法における造影剤に用いられ、そしてリンパ管組織を含む、組織の対照標本を製作するために用いられる。高分子の薬物複合体が非経口性の診断および治療の調製物の原型として詳細に研究されている。それらは、通常、担体（たとえばポリマー分子、小胞および微小粒子）とそれに付着した、または組み込まれた薬分子から成る。担体の役割は薬の生体分布を変え、望ましいターゲット組織における薬の濃度を増大させ、非ターゲット部位における薬の濃度を減少させ、それによって、副作用を抑制することである。ターゲット部位における

調製物複合体の蓄積を抑制するために、ターゲット組織に対して高親和性を有する分子は、担体の成分としてしばしば使用される。担体またはそれらの断片およびレセプターアンダード（たとえば、ホルモンまたはそれらの類似体）はターゲット指向薬物に用いられる高親和性分子の通常の例である。

薬物動態学の概念として薬物のターゲット指向は、通常、薬が担体の薬物動態または生体分布に著しい影響を与えてはならないという仮定に基づいている。しかしながら、いくつかの薬は血漿または細胞表面成分と相互作用可能であり、担体の生体分布と薬物複合体の生体分布の間に競争的な差異を生じる。

薬物複合体がターゲット組織に蓄積された場合、薬の作用は担体とのその付着または組み込みの方法に依存する。

リンパ管において、臓器内投与物質の少數のフラクションの出現が粗いポリマーおよびコロイドの時（たとえばポリビニルアルコール、ポリデキストラム、デキストラム、リボソーム）について報告されている。これらの物質はマクロファージまたは肥満細胞以外のリンパ管細胞にはまれにしか見出されず、リンパ管によるそれらの採取は極めて少なかった。類似の細胞が肝臓、脾臓、骨髄、腎臓および他の器官においてこれらの物質の採取を引き受けている。

発明の要約

一般に、本発明は、検出可能または生物学的に（たとえば治療上）活性である薬（薬がターゲット指向部位に含まれるか、または連結している担体に連結されているかまたは担体内に含まれ、それによって、薬がターゲット指向部位に存在しない場合よりも、より大きな度合い動物のリンパ系、たとえばリンパ管に蓄積する）を含み、動物、たとえば魚、爬虫類または哺乳動物、たとえばげっ歯類、たとえばマウスまたはラット、またはウサギまたはヒトの診断または治療のための物質を特徴とする。

好ましい実施形態において、物質、分子または粒子の径は100 nm以下である。さらに好ましくは、物質の径（たとえば水和した後）が10-30 nmである。

好ましい実施形態において、担体はポリマー（たとえば、直鎖状または非直鎖

状ポリマー）を含み、ポリマーはポリペプチド、多糖およびそれらの共重合体の群から選択される。ポリマーは、ポリリシン、たとえばポリリシン共重合体を含む。ポリマーは、ポリグリコシル化成ポリマーまたは天然のポリマーを含む。ポリマーはシリコンまたはリンまたは両方を含む。

好ましい実施形態において、ターゲット指向部位はC3または自然に存在するC3の変異体またはC3の断片に結合でき、たとえばターゲット指向部位はポリビニルアルコール、グリセロール、および破壊有分子（たとえば、シスチン）を含む。

好ましい実施形態において、ターゲット指向部位は炭水化物を含む。

好ましい実施形態において、炭水化物分子は、デキストラム、デンプン、β-グルカン、グルコース、フィコール（スクロースの合成ポリマーの商標名）およびそれらの誘導体および類似体の群から選択され、炭水化物は分子量1-20キロダルトン（kD）を有する。

好ましい実施形態において、ポリマーは担体を前に連結させる官能基を含む。官能基はアミノ基を含む。官能基はアミノ基誘導体を含む。官能基はカルボキシル基を含む。官能基はカルボキシル誘導体を含む。官能基はカルボニル基を含む。官能基はチオール基を含む。官能基はチオール誘導体を含む。官能基はハロゲンを含む。官能基はキレートを含む。官能基はキレート誘導体を含む。官能基はN-オキシスルファンimidエステルを含む。

好ましい実施形態において、担体は粒子を含む。担体は粒子の基質体を含む。担体はコロイドを含む。担体はコロイド状粒子を含む。粒子は粒子を前に連結する官能基を含む。粒子は有機の粒子を含む。粒子は無機の粒子を含む。粒子は有機の粒子の組成物を含む。粒子は無機の粒子の組成物を含む。粒子はラテックスを含む。粒子は炭を含む。粒子は酸化鉄を含む。粒子はシリコンを含む。粒子は放射性同位元素、たとえば、インジウム、チクニチウム、ヨウ素、ガリウムのうちのどれかを含む。そして粒子は、薬より成る。

好ましい実施形態において、薬は磁性標識、たとえば磁化鉄またはフェライト、ガドリニウム、マ

特表平7-509467 (5)

ンガムおよびジスプロシウムの群から選択される。剤は安定な同位元素、たとえば、惰性ガスの特性を有する、リン、シリコンおよびナトリウム、の群から選択される同位元素を含む。剤は、生物活性のある成分、たとえば放射性同位元素、たとえばアルファまたはベータ放射体、たとえばI、B-I、およびAlの群から選択された放射性同位元素を含む。剤は超常活性の酸化鉄を含む。剤はペプチド、たとえば酵素を含む。剤は出来、ホルモン、阻害剤、および抗腫瘍剤または生む物質である。

好みしい実施態様において、粗体の径は100nm以下である。さらに好みしくは、粗体の径、たとえば水滴¹の径は、1.0~3.0~ μ mである。

好ましい実施場所において、該断または治癒の物質は、傷部を動物（たとえばラットまたはウサギ）に動物の1 kgの体重に付き1 mgの用量で豚糞内に注入する場合、リンパ節組織の1 gに付き物質の注射された用量の少なくとも5%がリンパ節に蓄積するように、ターゲット指向部位が粗体に分布されている、多數のターゲット指向部位を含む。

好みしい実施経路において、診断または治療の物質は、物質を1 mMのケエン酸ナトリウムを含むラット血液の血漿に3.7で24時間さらす場合、物質に吸収されるタンパク質の80%以上が、C3かまたは自然に存在するその変異型であるように、ターゲット指向部位が物質に分かれている、多数のターゲット指向部位を含む。

好ましい実施態様において、診断または治療の物質は、1 mMのケン酸ナトリウムを含むラットの血漿に37°Cで2時間さらす場合、物質が、血液の血漿タンパク質において、その質量の50%以下を吸収するよう、ターゲット指向部位が物質に分布されている、を数のターゲット指向型をもたらす。

好ましい実験結果において、診断または治療の物質は、物質を1 mMのケエン酸ナトリウムを含むラットの血漿に3.7°Cで2時間さらす場合、物質に吸収されるタンパク質の80%以上が、C3かまたは自然に存在するその変異型であり、物質が血液の血漿タンパク質において、その量の50%以下を吸収するように明記ターゲット指向部位が物質に分布されている、少數のターゲット指向部位を含む。

物質を動物に投与、たとえば注射、たとえば、腹腔内注射することを含む。

好ましい実施態様において、物質の剤は、化学療法剤、過敏症用の剤、放射線療法剤、酵素療法剤、免疫療法剤の群から選択される。

船の型様において、本発明は、本発明の診断または治療の物質を供給すること、動物に診断または治療の物質を投与すること、および診断または治療の物質の分布を決定するために動物を可変化することを含む医療的装置を有する。

ましい実施態様において、削除化は終断または片側の物質を投与した後1、2、7、15、30、37、または45日、またはそれ以上の日数の後、行われる。

仙の態様において、本発明は、水発明の診断または治療の物質を供給しそして、多量または治療の物質を動物に投与、たとえば尿管内に注射、することによって利尿を、たとえば動物、たとえば魚、爬虫類、または哺乳動物、たとえばザウル類、たとえばラットまたはマウス、またはウサギ、またはヒトのリンパ系、たとえばリンパ節へ輸送する方法を含む。

他の例様において、本発明は、本発明の診断または治療の物質を供給し上記感染または治療の物質を動物に投与、たとえば臍嚢内注射することを含み、動物、たとえば鳥、牛、山羊または哺乳動物、たとえばばっ齒類、たとえばラットまたはマウスを含む。

ノベ、またはウツギ、またはヒトにおける炎症部位に剤を輸送する方法を含む。他の療法において、本発明は、本発明の診断または治療の物質を供給することと診断または治療の物質を動物に投与、たとえば脳膜内注射すること、そして診断または治療の物質の分布を粗定するかまたは検出することを含み、動物、たとえ鳥、爬虫類、または哺乳動物、たとえば、げっ歯類、たとえばラットまたはマウス、またはウツギ、またはヒトにおける炎症部位に剤を輸送する方法を含む。

始の態様において、本発明は、動物の診断または治療のための物質（たとえばヘム）を持つとし、物質がターゲット指向部位を含む担体を含み、それによって、ターゲット指向部位が存在しない場合よりも、担体がより大きな度合い動物のリバウンドに著しくする。

好ましい次生態系において、物質は、物質を前記動物に動物の 1 kg の体重にきり 1 kg の用意で既往性附する場合、リンパ液相の 1 % に似る既往物質の性

好ましい実施態様において、診断または治療の物質は、物質を1mMのクエン酸ナトリウムを含むラットの血漿に3.7℃で2時間さらす場合、物質が、前記物質の1位子に付与1分子以下のトランスフェリンに結合するようターゲット部位が物質に分布されている多數のターゲット指向部位を含む。0.9%NaCl水溶液中の物質の0.01-1.0mg/mlの混合物は物質を増殖に加えた後、2.5℃でインキュベートした場合、インキュベーションの初めの24時間中には凝集または沈殿しない。0.9%NaCl水溶液中の物質の0.01-1.0mg/mlの混色物は、物質を前記溶液に加えた後、均一の磁場0.47テスラで3.7℃でインキュベートした場合、インキュベーションの初めの72時間中には凝集または沈殿しない。

他の部位において、本発明は、ターゲット部位（たとえば脱水化物）を含む固体を供給し、剤を液体と連結し、剤をターゲット指向部位と連結することを含む、診断または治療の物質を調製する方法を特徴とする。

好ましい実験結果において、担体はポリマーかまたは粒子である。剤は放射性化合物かまたは造影剤である。有機の分子は担体に連結されている。

他の選択において、本発明は、本発明の診断または治療の物質を含む薬剤組成物および医学上有用される化合物（たとえば酵素剤）を含む上記

他の個体において、水明晃は、本角明の診断または治療の物質を供給し、動物たとえば爬虫類または哺乳動物、たとえばげっ歯類、たとえばマウスまたはラット、またはウサギまたはヒトに診断または治療の物質を投与、たとえば注射、たとえば腹腔内注射し、そして動物における診断または治療の物質の分布を測定または検出することから成る、組織または組織、または器官、たとえばリンパ系、たとえばリンパ節を研究、たとえば顕微化する方法を模型とする。

好ましい実施態様において、分布の測定または検出はガンマシンチグラフィー、フォトンエンミッション断層撮影法、磁気共鳴画像法、磁気測定法、磁気測定画像法により行われる。

他の様相において、本発明はリンパ系の障害または疾患を有する動物、たとえ
ば魚、爬虫類、哺乳動物、たとえばげっ歯類、たとえばマウスまたはラット、ま
たはウサギ、またはヒトを治療する方法を特徴とし、本発明の該断または治療の

射された用量の少なくとも 5% が少なくともひとつリバースに蓄積するよう ターゲット指向部位が体内に分布されている、多数のターゲット指向部位を含む。物質は、物質を 1 mM のクエン酸ナトリウムを含むラット血液の血漿に 37 °C で 2 時間さらす場合、物質に吸収されるタンパク質の 80% 以上が C3 か、または自然に存在するその変異型であるようにターゲット指向部位が物質に分布されている、多数のターゲット指向部位を含む。物質は、1 mM のクエン酸ナトリウムを含むラットの血漿に 37 °C で 2 時間さらす場合、物質が血液の血漿タンパク質において、その重量の 50% 以下を吸収するようにターゲット指向部位が物質に分布されている、多数のターゲット指向部位を含む。物質は、物質を 1 mM のクエン酸ナトリウムを含むラットの血漿に 37 °C で 2 時間さらす場合、物質に吸収されるタンパク質の 80% 以上が C3 か、または自然に存在するその変異型であり、物質が血液の血漿タンパク質において、その重量の 50% 以下を吸収するようにターゲット指向部位が物質に分布されている、多数のターゲット指向部位を含む。

用語“担体”は、組み込み可能な、たとえば剤に連結可能なまたは剤を含むかまたは保持可能な高分子、たとえばポリマーまたはコロイド状粒子を意味し、ターゲット指向部位を含むかまたはそれに連結である。

用語「炭水化物」は、(A) 炭水化物、すなわち、式 $[C(H_2O)]_n$ により表される物質であり、 n が 2 以上であり、1 単位以上の $[C(H_2O)]$ を含む化合物であり、(B) それらの誘導体、たとえばデキストラン、すなわち、炭水化物 (たとえば、单糖類、オリゴ糖類、多糖類) の 1 以上の任意の官能基、原子、または結合に関わる酸化、還元、置換、脱離、加水分解、重合、縮合、転位、または他の反応により生成され得る物質、そして天然の化合物、化学変化した化合物および完全な合成化合物、加水分解、重合、縮合、転位、または他の反応により生成され得る物質、そして (C) (A) または (B) 群の化合物の基または断片、たとえば、水酸基、グリコール基、ヘミアセタール基または上記の基の組み合わせを含む (A) または (B) 群の化合物の断片を意味する。

用語“グラフト”は、共有結合、非共有結合の会合、または共有結合および非共有結合の結合を意味する。

特表平7-509467 (6)

用語“コア”はターゲット指向部位または部位（site）を除外した担体の内部（たとえば、分子、粒子、ミクロスフェア、マイクロカプセル、小胞またはそれらの組み合せ）を意味する。

用語“炭水化物グラフト担体”は、ターゲット指向部位を形成する炭水化物分子に連結した、たとえばグラフトした、コアを含む任意の担体を意味する。

用語“剤”は、投出可能な剤、たとえば、診断の剤（すなわち、診断方法に有用な物質、たとえば放射性核種、常磁性物質、強磁性物質および超常電性物質）および生物活性のある剤、たとえば、治療の剤を意味する。

用語“保護された担体”は、担体が投与される動物の細胞またはタンパク質との相互作用からグラフト炭水化物分子により、それへ遮断される、コアと剤を（たとえば、空間的に）保護している担体を意味する。

用語“ターゲット指向部位”は、炭水化物を含みおよび/またはC3（担体の第3の成分）または自然に存在するC3の断片または変異型に結合できる担体上の部位を意味する。

用語“生物活性”は、生物系に影響を及ぼすことができる物質を意味し、たとえば、治療剤および減弱化合物、有機化合物を含む。

ターゲット指向部位、好ましくは多数のターゲット指向部位、たとえばC3と相互作用できる外側の炭水化物構造または他の構造を含む高分子およびコロイド状複合体は、リンパ組織への脈管内投与された複合体の効率的な送達を可能にすることが見出されている。理論に神られるのではないが、本発明の、たとえば炭水化物グラフト（たとえばデキストラングラフト）ポリマーおよびコロイド状粒子のターゲット指向部位は肝臓、および骨髄における認識を避けるが、リンパ節において容易に捕捉されるようである。この作用は効果的な移送過程を可能にし、リンパ節への局在性脈管内投与複合物を生じる。

リンパ節において担体複合物を引き受けたと信じられている炭水化物は、それら自体リンパ節組織に対して親和性を有せず、それら内体脈管内投与の後、リンパ節に顕著な量を蓄積するかもしれないし、蓄積しないかもしれない。しかしながら、それらはリンパ組織において担体の蓄積を引き受けている担体のターゲット指向部位を形成できる。理論に神られるのではないが、恐らくC3または自然に

存在するその断片またはC3の変異型との炭水化物の相互作用は、本発明の診断および治療物質の生体分布において苦しい役割を果たしているであろう。したがって、C3および発生するC3の断片または変異型と相互作用可能な、たとえば結合または結合可能な炭水化物以外の物質は、本発明のターゲット指向部分として使用される。したがって、この発明において用いられるアプローチは、高親和性分子を用いる輸送によりターゲットとされる、通常に用いられる輸送システムとは異なる。

この発明の剤の担体はリンパ組織への脈管内投与複合体の効率的なターゲット指向輸送を可能にする炭水化物分子（ターゲット部位を形成する）によりグラフトされている。炭水化物グラフトされた剤の担体は、好ましくは保護（たとえば空間的に）された複合体においてリンパ組織へ広範囲の診断および/または治療剤の到達のために設計されている。

担体の内部は診断および/または治療剤を担持する分子またはコロイド状粒子の構造を含む。その運動機能に加えて、ターゲット指向部位は、血液中の細胞表面タンパク質およびオブソニン作用タンパク質との相互作用に対して担体の内部を保護する。

本発明の診断の物質または生物活性のある物質または治療の物質は、担体に剤をグラフト、たとえば吸着または組み込むことにより形成される高分子、たとえばポリマー、または微粒子の複合体および組成物を含む。したがって、本発明の診断の物質および生物活性のある物質または治療の物質は、リンパ組織の診断または/および治療のために脈管内投与の後リンパ節へ剤を輸送できる。

本発明は、リンパ系疾患および障害（たとえば癌のリンパ転移、リンパ腫、リンパ節形成等）の診断、治療および予防のために、上記診断の選別のために、リンパ系の構造および機能の研究のために、免疫調節または免疫化のために、そして生化学的監視のために有用である。

本発明は、診断剤および生物活性のある剤または治療剤のリンパ組織への輸送のためにそれらを適応にする生物学的特性を示す可溶性ポリマーまたはコロイド状の複合体（組成物）の脈管内投与に沿づく、診断物質および生物活性のある物質または治療物質を提供する。本発明は、脈管内投与の後、リンパ組織、主にマ

クロファージの存在する領域に蓄積するポリマーおよびコロイド状の剤の担体、およびリンパ組織、特にリンパ節への診断剤および生物活性のある剤または治療剤のIn vivo送達のためのこれら担体の使用を含む。

本発明の他の特徴および利点は下記の好ましい実施例および特許の請求の記載から明らかであろう。

詳細な説明

図面を初めに簡単に説明する。この特許の出願はカラーで仕上げられた少なくとも1枚の写真を含んでいる。カラー写真を有するこの特許のコピーは要請と必要経費の支払いにより、特許局様式により提供される。

図面

図1a～1bは、好ましい炭水化物グラフト担体の構造の2つの概念図。

図2は、ポリマーを主成分とする、炭水化物グラフト担体を調製するための3つの基本的方法の図である。

図3は、粒子を主成分とする、炭水化物グラフト担体を調製するための3つの基本的方法の図である。

図4a～4cは、実施例2に従い調製された製造物を用いて、ラットおよびウサギにおけるアンチグラフィー画像の写真である。

図5aおよび5bは、実施例B（ポリマー）および13（粒子）に従い調製された放射性標識製造物の24時間の生体分布のグラフである。

図6は、実施例5に従い調製された製造物の局部注射（左の西脇）、静脈注射（中大と右の西脇）の24時間後、ラットのマッハ像の比較写真である。

図7は、実施例7に従い調製されたリンパ節組織における蛍光標識物の微小分布の写真（拡大：800倍）である。

図8aおよび8bは、実施例13に従い調製されリンパ節切開の37日前に投与された粒子を主成分とする製造物（図8a参照）と、実施例7に従い調製され切開の24時間前に同じ動物に投与されたポリマーを主成分とする製造物（図8b参照）のリンパ節組織の同じ部位の比較写真（拡大：400倍）である。

図9aおよび9bは、実施例8に従い調製されたインジウム標識、ロードミンX添加の調製物の静脈注射24時間後、ラットの全身シンチグラム、それぞれ正面および背面の写真である。そして

図10aおよび10bは、実施例8に従い調製された調製物の投与24時間後、それぞれ、研究された炎症（ウサギ）と隣接（ラット）を有する動物のマッハ像の写真である。

リンパ組織

脈管内投与の後、血液中を循環している高分子のフラクションは内皮を通して間隙空間にゆっくりと侵入する。間隙空間に保持されない場合、血液タンパク質では自然に起こるように、高分子はリンパ系により排出され一遍のリンパ節を通して血流に戻される。

臓器高分子およびコロイド状粒子は主に肝臓、脾臓および骨髄の食食細胞により取り込まれる。この過程はオブソニン作用（すなわち、ポリマー分子または粒子の血液タンパク質との結合）により、しばしば介在される。多くの可溶性ポリマーおよびコロイドは、これらの細胞により表面から吸引に（すなわち数分以内）取り込まれる。局部の細胞吸引の後、同じポリマーおよびコロイドは、食作用によるそれらの攝取の結果としてリンパ節に蓄積することに注目すべきである。過程は肝臓、脾臓およびその他諸器のマクロファージによる攝取に類似している。恐らく、肝臓、脾臓および他の臓器における食作用により生じる敏感な血液のクリアランスは、これらのポリマーおよび粒子が脈管内注射後間隙空間に到達するための充分な時間を与えない。対照的に、局部的または脈管内投与の後、蓄積せずにリンパ節を通過するポリマー（たとえばデキストラン）は、肝臓、脾臓およびリンパ節において顕著な捕捉なしに長い時間、血中をしばしば滞留している。

リンパ組織は、皮質（たとえば、小胞を含む主にBリンパ球の存在する領域）、皮質傍（たとえば、主にTリンパ球の存在する領域）、およびマクロファージの存在する領域によりしばしば囲まれているリンパ節を含む、明確な構造的構成要素から成る。リンパ節の特徴的な構造は疾患により変えられ、転移過程において免疫細胞により部分的または完全に置換される。したがって、上記構成要素のひと

特表平7-509467 (7)

空間的に保証し、その結果、血漿タンパク質および細胞によるコアおよび剤の認識を最小にする。炭水化物分子は炭水化物を形成し、その結果小さな分子の複合体内部への付加を可能にする。炭水化物分子は、小さな分子さえも通過しない網目な層により置換されるか、またはそれと結合する。

担体の内部は、診断剤および生物活性のある剤または治療剤を担持するためには設計された分子またはコロイド粒子の構造を含む。炭水化物により提供される空間的保証により、コアの内容物および構造は $1 \text{ n} \text{m} \times 1 \text{ n} \text{m}$ の複合体の分布に影響を与えない。したがって、炭水化物がコアに連結、たとえばグラフトして、その結果ターゲット指向部位を形成し、かつ炭水化物グラフトコアの総サイズが下記の限界を越えないならば、剤を組み込む可能などんなコアもこの発明の診断物質および生物活性のある物質または治療物質に使用される。ポリマー分子およびコロイド状粒子は、この発明の好ましいコア構造を代表する(図1-aおよび1-b参照)。図1-aはポリマーを主成分とする可溶性複合体(すなわち、コアはポリマー分子である)を示す。図1-bはコロイド状複合体(すなわちコアは粒子である)を示す。両者において、炭水化物分子が複合体を空間的に保護する。

本発明の診断物質および生物活性のある物質または治療物質は、リンパ組織への診断剤および生物活性のある物質または治療物質は、リンパ組織への診断剤および生物活性のある物質または治療物質は、リンパ組織への診断剤および生物活性のある物質または治療物質は、好ましくは合併症および有効作用を起こさず、生体適合性で、特に生体分解性である。

本発明の診断物質および生物活性のある物質または治療物質は、臓器内投与によりリンパ組織に剤の効果的な輸送を提供する。

本発明の診断物質および生物活性のある物質または治療物質は、リンパ組織への診断剤および生物活性のある物質または治療物質は、リンパ組織への診断剤および生物活性のある物質または治療物質は、好ましくは合併症および有効作用を起こさず、生体適合性で、特に生体分解性である。

この発明の高分子およびコロイドの剤の複合体は共通の構造的構成要素を有する複製物の族を形成する。剤複合体の共通の構成要素は外部の炭水化物を含む担体と剤である。担体はポリマーかまたは粒子である。剤は診断または生物活性のある、たとえば治療剤であり、そして担体の内部コアに連結している。

担体

本発明の担体は、 $1 \text{ n} \text{m} \times 1 \text{ n} \text{m}$ で剤を運搬するための構造を提供する内部コア、およびターゲット指向部位から成り、ターゲット指向部位は炭水化物の他の部分を含み、C3または自然に存在するC3の断片または変異型に結合でき、 $1 \text{ n} \text{m} \times 1 \text{ n} \text{m}$ で複合体の目的的位置への運搬を可能にする。

好ましくは、炭水化物分子は外側の分子との相互作用に対してコアおよび剤を

容易に遮断され得る。

ポリマー材料およびコロイド材料の公式の定義にはっきりした明確な構造はない。交差結合したポリマー構築物はコロイドまたは複合体ポリマー分子として分類される。

この発明の診断物質および生物活性のある物質または治療物質のためのコアとしてコロイド状粒子の実行可能性を示すために、無機のコアを有する粒子を主成分とする担体を型別した(実施例1-1-14参照)。粒子を主成分とする担体の内部コアは、金属水酸化物または酸化物粒子(たとえば、水酸化インジウム、常磁性酸化鉄(II)および超常磁性酸化鉄(II)または酸化物粒子(たとえば、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)スペーサー基および分解性(たとえば、加水分解可能、酸化可能、還元可能)結合を含む)。

ポリマー(可溶性)担体

ポリマーは剤を保持するためのそれらの大きな吸収力と多くの種類の剤を保持するそれらの能力により剤の担体として、しばしば用いられる。多くのポリマーは生体分解可能であり、それらの生体分解および代謝の産物は毒性のほとんどない、または毒性のないことを示している。炭水化物の連結および剤を可能にする官能基、たとえばアミノ基、カルボキシル基、およびカルボニル基、組み込みを特徴とするポリマーは、この発明のコア成分として好ましい(たとえば、 $1 \text{ n} \text{m} \times 1 \text{ n} \text{m}$ で分解性の化学結合(たとえば、ポリマーの主鎖におけるペプチド結合、ヘミアセタールまたは醇酸結合およびエステル結合)を有するポリマー)。適切なポリマーは、ポリペプチド、多糖類、ポリエチレンおよびポリアミドを含む。

たとえば、ポリレリシンは、コア形成に好適な特に好ましいポリマーである(実施例1-8参照)。ポリレリシンを主成分とするポリマー担体の内部コアは、單一のポリリシン分子、分枝したポリレリシン、またはデキストラン分子をコアの構成性分子として用い、外側のターゲット指向部位の一部として用いない。内部のデキストラン分子およびポリリシン分子により形成される分子の“骨格”(実施例9および10参照)を有む。これらのモデルコアは、たとえば実施例3-8に記載されているように改変され、診断剤および生物活性のある剤または治療剤も充填される。

粒子を主成分(コロイド状)とする担体

粒子を主成分とする担体において、コロイド粒子は、細胞および血漿タンパク質との相互作用に対してコロイド状粒子の表面を空間的に保護する炭水化物(たとえば、デキストラン)の網目な層によりグラフトされることが好ましい。粒子を主成分とする担体は、2つの理由によりこの発明の好ましい担体の群として含まれる。第一に、いくつかのコロイド状粒子は効果的な診断(たとえば、超常磁性NMR造影剤)および治療剤(たとえば、局部の退温症のための強磁性剤)であることが知られている。第二に、親水性の剤は、コロイド状親水性の粒子コア

炭水化物

完全合成ポリマーを含む炭水化物ならびにそれらの誘導体および類似体は、血漿タンパク質および細胞レセプターによる、それらの認識に対応して4つの群に分けられる。

群(1)は、細胞レセプターにより直接そして特別的に認識される物質、たとえば、グラクトースの残基を含む化合物、N-アセチルグルコサミンおよび特定の細胞レセプターの他のリガンドから成る。

群(2)は、血中に存在する免疫グロブリンにより特異的に結合される抗原性化合物に代表される。血漿レクチンのリガンド、たとえばマンノース結合タンパク質(NBP)のリガンドはまた特異的に結合され、したがって群(2)に属する。

群(3)は、担体3(C3)成分だけにより非特異的に認識される炭水化物から成り、水酸基を含む非結合化合物または他の親水性の基に結合し、C3のチオエチル部位と反応できる。他の群の炭水化物もC3により認識されるが、他の型の相互作用がそれらの生物学的作用より優る。

群(4)は非特異的相互作用(たとえば、液滴の水素結合、静電的相互作用、ファンデルワールス相互作用および疎水性相互作用)により多くの血漿タンパク

特表平7-509467 (8)

質および細胞表面タンパク質に結合している炭水化物を含む。細胞表面および血漿タンパク質の特性は依然として完全に確認されていないので (Rと認識因子の似た成分とのMBPの同一性という最近の発見により明らかにされたように) 群4のいくつかの構成物は、実際には群1または2に属する。いかなるメカニズムによって ^{35}S - $\text{V}\text{I}\text{V}\text{o}$ で認識されない炭水化物の存在は証明されていない。炭水化物は抗体の構成の成分として用いられるが、連鎖分子としては通常用いられない。レセプターによる認識可能な物質を含む群1の炭水化物は、レセプターへのターゲット指向剤の選択成分として研究された。群2の構成物の脳室内投与も、通常、肝臓および脾臓における調製物の蓄積を生じ、急速な免疫応答を引き起こす。これらの理由により、それらはワクチンの構成として主に用いられ、脳室内投与の選択材料としてそれらを使用することは好ましくない。群4の炭水化物は、それらの多様性を考慮すると、前述の生物学的特性を有しない。しかしながら、特徴決定されていない生物学的特性を有する群4の物質の使用は望ましくないことは明白である。群3の多糖類は血中に長い留置時間を有し、レセプター系との関係において中性であることが知られている (たとえば、デキストラン)。多糖類は便利な生体適合性分子、そして効果的なコロイドの安定剤として用いられるが、特に、ポリマーまたはコロイド状の薬物担体の選択材料としては用いられない。

群3の炭水化物は本発明に使用できる。群1、2および4の炭水化物はあまり好ましくない。

候補の炭水化物の適合性は、炭水化物がリンパ系への本発明の診断物質および生物学活性のある物質または治療物質の選択的なターゲット指向を生じるかどうかを判定することにより評価できる。たとえば、候補の炭水化物は、実施例2の方法に類似の方法により調製された診断物質または治療物質に組み込まれ、実施例5に従い標識され、実施例16に示すように動物 (たとえばラット) に投与される。本発明における使用に好適な炭水化物はラットに体重1mg/1kgの用量で投与された場合、少なくともひとつのリンパ節にリンパ節細胞1グラムに付き注射された用量の1%以上、好ましくは10%以上の (診断物質および生物学活性のある物質) の蓄積を示す。

この発明の担体の可能な成分と構造的多様性を考慮して、我々はこの発明の担体の生物学的特性のために重要な構造的成分に焦点を当てて、担体の合成の一般的な方法をここに提供する。いくつかの担体の合成の詳細は実施例に示されている。

ポリマーを主成分とする担体および粒子を主成分とする担体を合成する好ましい方法は、あるコアに関して、連結される炭水化物の数とサイズが (1) コアの確実な空間的保護を可能にし、そして (2) 適切な担体サイズおよび剤の分子に対して担体の充分な収容力を提供するのを最適にするという必要条件に焦点を当てている。

さらに、MR1-T1剤の好ましいポリマーを主成分とする担体の第3の必要条件は、炭水化物層が担体中のT1剤の場所への水分子の拡散を可能にすることである。

したがって、炭水化物分子の数とサイズが空間的保護の程度と直接関係しているにいかかわらず、炭水化物でコアを過剰負荷することは、それが剤の結合に使用できるコアの問題を制約するので望ましくない。この矛盾を克服するために、分枝したポリマーコアまたはラテックスを線状のコア分子の代わりに用いる。

ポリマーを主成分とする (可溶性) 担体の合成

本発明のポリマーを主成分とする担体は、好ましくは、次の3方法により調製される。

- (1) 炭水化物をポリマー分子に連結、たとえばグラフトする。
- (2) 炭水化物含有の可溶性生成物 (たとえばモノマー) を共重合する。そして
- (3) 固体のポリマーの複合材料またはゲルを分解する (図3参照)。3方法は類似の生成物を生じる段階の段階を含む。

この発明の例は、ポリマーコアへ炭水化物分子の新規作成グラフトに基づいている。なぜなら、それは実験室規模の合成に最も便利な方法だからである。炭水化物分子は、たとえばコアポリマーの選択された官能基に炭水化物を付着させるためにオリゴ糖の末端基を用いて、たとえば1点修飾により付着される。異質な合成ポリペプチド (すなわち1以上のアミノ酸から成る) と1点修飾を用いること

この発明の好ましい炭水化物 (たとえばデキストラン) はレセプター認識可能な部位、血漿レクチン認識可能な部位および高抗原性部位を含むではない。また、炭水化物はC3成分 (細胞の第3成分) 以外の細胞質および血漿タンパク質に対し非特異的に結合してはならない。ターゲット指向部位の炭水化物分子は、リンパ節における炭水化物グラフト担体の蓄積を引き受けがるが、それらはそれら自体、脳室内投与の後、リンパ節に顕著な蓄積することもあるし、しないこともある。

理論により持られるのではないが、この発明の炭水化物グラフト (たとえばデキストラングラフト) ポリマーおよびコロイド状粒子は肝臓および骨髄における軽微な蓄積を示すが、リンパ節の立作用のある細胞により容易に攝取される。この作用により、効果的な移動過程が可能になり、リンパ節における脳室内投与された調製物の局在化を生じる。

炭水化物分子、特にオリゴ糖類および多糖類およびそれらの類似体は、空間的保護を提供するとはじめられている。なぜなら、それらは発明のコアおよび剤との細胞表面タンパク質の大きな分子および成分の相互作用および吸着を防ぐからである。内部コアの空間的保護は、多くの数の長いポリマー状炭水化物または類似分子を担体にグラフトする場合、最も効果的である。しかしながら、担体の総サイズを最適な範囲内 (すなわち100nm以下、好ましくは水の凝固において10-30nm) に維持するために炭水化物の長さおよび数は限定される。さらに、小さな炭水化物分子を用いる場合、担体の収容力 (担体物質の量当りの剤の量) は大きい。これらの前提条件を考慮すると、1-20KDのサイズの範囲のオリゴマーの炭水化物およびポリマーの炭水化物が好ましい。

好ましい炭水化物分子の例は、デキストランおよびその合成類似体、デンプンおよびその誘導体、ポリグルコシル化合成ポリマーおよび天然ポリマーを含む。他の炭水化物、それらの誘導体および他のC3結合分子もまた本発明の担体の成分として用いられる。さらに、2以上の異なる炭水化物を同じ担体に付着させ、その生体分布を改善させる。

担体の合成

により、薬剤用調製物の好ましい構造が得られる。

実施例は、剤がコアポリマーに炭水化物分子の付着前または後に付着できることを示している。選択的な反応を用いる場合、反応の結果は質的に同じである。しかしながら、好ましくない副産物が形成されることもある。たとえば、炭水化物 (たとえばデキストラン) の後、担体コア (たとえばポリシリシン) へのDTPA酸化無水物の付着は、エスチル結合の形成によりデキストラン分子へのDTPAの結合を生じる。

生化学的の従来方法、たとえば特殊なスペーサー分子を用いて担体への剤の結合 (たとえばコアポリマー分子へのスペーサー分子の付着) も用いることができる。担体の生体分解性を改善するために、容易に分解できる化学結合を担体構造に導入できる。スペーサー分子は分解可能な結合も含み、したがって担体からの制御された剤の放出のシステムを提供する。

粒子を主成分 (コロイド状) とする担体の合成

この発明の粒子を主成分とする担体は、好ましくは、次の3方法により調製される。1) 以水化物を单粒子に連結、たとえばグラフトする。2) 炭水化物の存在下でコロイド状粒子を形成する (たとえば、無機の粒子に関して)。そして3) 炭水化物含有可溶性生成物からコロイド状粒子を形成する (図3参照)。第1の方法は、荷電の粒子を主成分とする担体の調製に好ましい。第2の方法は無機の粒子を主成分とする担体を調製するために好ましい。第3の方法はミルおよび小粒形成に好ましい。

粒子を主成分とする担体を合成する好ましい方法は、グラフトされる炭水化物分子の数を最大にすることに焦点を当てる。粒子を主成分とする担体において、空間的保護の質は特に重要である。なぜなら、コロイド状粒子は多くの血液タンパク質を容易に吸着し、急速な血液クリアランスと肝臓および脾臓における粒子の蓄積を生じるからである。

炭水化物安定化 (たとえばデキストラン安定化) コロイド形成のいくつかの方法が知られているが、それらの大部分は、それらの安定剤により粒子の確実な保護を提供しない。本発明者は、合成の成功は粒子形成の調製方法だけでなく、反

特許平7-509467 (8)

の条件のいくつかの詳細にも依存していることを見出した。たとえば、デキストランの存在下で酸化鉄を沈殿させることにより、超低毒性デキストラン塩酸コロイドの公表された方法は、リンパ組織へのこれらの粒子の顕著な送達を提供しない。しかしながら、高濃度のデキストラン、低濃度の鉄塩の存在下で、そして異なる温度下での合成(実施例13参照)は、炭水化物グラフトしたポリマーのそれに類似の生体分布を有する顕著なデキストラングラフト粒子の形成を提供する。

リンパ組織への炭水化物グラフト担体の輸送

担体の生体運動学および生体分布

静脈投与後の炭水化物グラフト担体の生体運動学がラットおよびウサギにおける(実施例15参照)流動研究によるサンシングラフィーおよび多数の静的研究により研究された。第四パラメーターはPapilisov, M. ら "Magnetic Drug Targeting. In Vivo Kinetics of Radiolabelled Magnetic Drug Carriers" Int. J. of Pharm., 1987, 40: 201-6に記載され、本出版物の文献文獻に記載されている不可逆的動態モデルに対応するクリアランス/蓄積率として計算された。

四製物の血液クリアランスは $20 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 1 \text{mg}/\text{kg}$ の用量範囲内では実質的に单一指数関数であることが見出された。用量 $0.5 \sim 1 \text{mg}/\text{kg}$ での完全無傷なラットにおける半クリアランス時間は、デキストラングラフト酸化鉄(実施例13参照)について2.4時間、デキストラングラフトポリレリシン(実施例2参照)について1.6時間、そしてデキストラングラフトポリレリシンRhX-DTPA(実施例2参照)について2.2時間であることが見出された。

動的サンシングラフィーは、リンパ節の輪状膜および大動脈傍の群がラットにおいて注射2-4時間後、ウサギにおいて注射7-10時間後認識可能になることを示した。他の節はラットにおいて6-10時間後、そしてウサギにおいて12-24時間後充分な信号/バックグラウンド比を現わした。図4a(前方図像)はラットリンパ節の輪状膜および大動脈傍群が顕著な攝取を示したことを見出された。

リンパ節内の四製物の微小分布は、実施例7に従い調製されたフルオレセイン標識および ^{113}In 標識の担体の静脈注射24時間後、採取したリンパ節を光学蛍光顕微鏡およびオートラジオグラフィーにより調べられた(実施例17参照)。フルオレセインのかわりにロードミンに置換した類似の実験は、類似の結果を提供した。

図7に示すように、リンパ節組織の蛍光顕微鏡およびオートラジオグラフィーは、デキストラングラフトのポリレリシンの最も顕著な蓄積がリンパ節の輪状膜に位置する細胞、皮質および皮質外の散在細胞(たとえばマクロファージおよび/または肥満細胞)であることを示した。リンパ球により占拠された領域における蛍光物質の量は前者ではなかった。

デキストラングラフト酸化鉄粒子の微小分布を、静脈投与24時間後、リンパ節組織の光学顕微鏡およびオートラジオグラフィーにより研究した(実施例13参照)。粒子を生成分とする担体の微小分布は、ポリマーを生成分とする担体のそれと類似であることを見出した。本出版物で報告した実験のポリマーおよび粒子を生成分とする物質のデータおよび類似の微小分布は、既存の炭水化物グラフト粒子が生物学系のタンパク質、細胞および他の成分と相互作用をせず、または顕著な相互作用をせず、したがって粒子の生体分布に顕著な影響を与えないという仮定と一致しない。対照的に、以前示されているように、可逆的に付着した炭水化物分子を有する粒子(したがって、空間的に保護されていない)は肝臓および肺臓により効率で血液から消化化される(Papilisovら, 1987, Int. J. Pharm.)。

ひとつの実験において(実施例18参照)、実施例13に従い調製された第一の四製物の配置を、実施例8に従い調製された第一の四製物の37日後に投与された第二の四製物の配置と比較した。この実験において、酸化鉄粒子の四製物を、ロードミンX標識のポリマー四製物を投与する37日前に投与した。ロードミンX標識した四製物の投与24時間後にリンパ節を採取した。細胞片を透過光および蛍光性の顕微鏡で研究した。図8aは酸化鉄粒子の配置を示すリンパ節組織の写真である。図8bは、図8aおよび8cのようにリンパ節組織の同じ領域の蛍光顕微鏡写真である。図8cに示す歯齒粒の配置は、実施例13に従い調製されたデキ

スト。図4b(前方図像)は輪状膜、輪状膜、および輪状膜のリンパ節が、ラットの約50%において輪状膜(輪状膜)で見えたことを示す。図4bおよび4c(右側方斜めのウサギの節)は、輪状膜のリンパ節は見出しが少ないがラットとウサギにおいて見えたことを示す。他のリンパ節は顕著な攝取を示したが、それらの大部分は γ 線により目視化された。輪状膜の活性が全ての場合において高く、輪状膜は放射性標識の濃度が非常に低いことを示した。輪状膜、輪状膜およびリンパ節の活性は、それらの質量比が約500:40:1であるにもかかわらず、輪状膜の活性信号を示す。他の組織における攝取は、ラットおよびウサギにおけるバックグラウンドに実質的に匹敵すると考えられた。所見は少なくとも96-100時間は暗闇に変化せず、再分布の速度の速いことを示唆した。

実施例8および13に従い調製された四製物を用いる他の実験(実施例16参照)において、放射性標識の生体分布を従来法に従いラットで研究した(図5aおよび5b参照)。最大の担体攝取はリンパ節の輪状膜と大動脈傍群に見出された(異なる四製物について細胞1グラムに付き平均20-50%用量、そして選択された場合において組織1グラムに付き140%までの用量)。他のリンパ節は異なる攝取を示した。他の組織における担体の蓄積は非常に低かった(0.01-0.2%用量/グラム組織)。実施例16に従うが異なる用量の注射を用いた実験は、生体分布の用量依存性を示している。最適の細胞は重量の1kgに付き担体5μg~50μgであることが見出された。

これらの研究において、我々は、いくつかのリンパ節において組織1gに付き選択された用量の100%以上の蓄積を生じ、リンパ節に静脈投与されたポリマーの有するフラクション(20%以上)の移動を観察した。炭水化物グラフト四製物の局部注射時、リンパ節への効率的送達を提供した(図6参照)。図6において、左の細胞は、この発明の炭水化物グラフト四製物の局部注射から得られた(実施例2参照)、中央および右の細胞は、この発明の炭水化物グラフト四製物の静脈注射から得られた。空間的に保護された担体四製物の局部注射は、所見のリンパ節において材料の約90%攝取を示した。

リンパ節における担体の微小分布

ストラングラフト部位がリンパ節で分解せずに30日以内に代謝されないことを示す。また、これはロードミンX標識のポリマー四製物の発現な蓄積の領域から主に離れた領域に蓄積されていた。この実験の詳細については実施例18参照。

リンパ組織に輸送される診断物質および生物活性のある物質または治療物質の使用

下記に示すように、この発明の診断物質および生物活性のある物質または治療物質を広範囲の種々の診断剤および治療剤の輸送に用いる。この発明の診断調製物の価値は、リンパ節の食作作用のある細胞におけるそれらの選択的蓄積(これがリンパ節の疾患(たとえばリンパ癌)に対して最新の診断方法(たとえば磁気共鳴像法およびサンシングラフィー)の感度および解像度を増大し得る)に基づいている。リンパ組織は、本発明の担体を長時間(すなわち、数時間または数日間さえも)保持する。長い滞留時間により、リンパ組織の治療のためにこれらの担体の使用(特に、この発明の診断物質および生物活性のある物質、または治療物質を用いて、蓄積の部位に剤を放出する場合)が可能になる。

それらの長い滞留時間および時間の空間への侵入により、炭水化物グラフト担体は、さらに別のターゲット特異的分子(たとえば、抗体等)の認定にも効果的に用いられ、血液にさらされる他のターゲット組織または組織への薬物輸送を提供する。

剤

この発明の剤は診断剤および生物活性のある剤または治療剤を含む。剤は、コアに、軽くは化学結合、複合体形成、カプセル化または高分子または微粒子複合体内に剤の蓄積を提供する全ての方法により担体のコアに組み込まれる。

单一の担体分子または粒子により選択される剤の分子数は、剤のサイズにだけ依存し、大きな分子にはひとつ、小さな分子、たとえばキレート基には数百と異なる。

この発明の担体により選択される剤分子のサイズの上限は担体のサイズそのものに依存し、複合体の生体分布のための最適なサイズを超えてはならない。

たとえば、比較的それらの大きなサイズのために、タンパク質分子の限られた数だけがこの免のコア構造を形成し、高分子複合体の最適な量の範囲内に限る。生化学の方法における最近の発見は、タンパク質の特異的属性の著しい減少なしにほとんど全てのタンパク質を組み込んだ担体コアを形成することを可能にしている。

上記を考慮して、炭水化物結合担体により選択される剤の多様性は、この免の診断物質または治療物質の広範囲の様々な適用を示唆している。診断剤はシンチグラフィーおよびフォトンエミッショントルソ撮影の測定のための放射性標識（たとえば、インジウム、チクニチウム、ヨウ素、およびガリウム）、磁性標識（たとえば、鉄、ガドリニウム、マンガンおよびジスプロシウム化合物に基づく、たとえば核磁気共鳴画像法のT1およびT2剤）および安定な同位元素（たとえば、NMRスペクトル標識としてリン、シリコン、ナトリウム）を含む。

生物活性のある剤および治療剤は、たとえば、アルファまたはベータ放射放能性同位元素、無機化合物（たとえば腫瘍の過温症のための剤として硫酸鉄）および有機化合物（たとえば、タンパク質、ペプチド、酵素、毒素、ホルモン、阻害剤、および抗生物質）を含む。炭水化物連結、たとえば、炭水化物グラフトした、抗腫瘍剤または免疫調節物質を充填した化合物をターゲット指向抗転移リンパ節活性薬物とし使用できる。実施例7および8に示すように、2つ以上の異なる剤を同時に担体に接続できる。

この免の診断物質および生物活性のある物質または治療物質のさらに別の剤、およびそれらの可能な適用は表1に記載されているものを含む。

表1

適用	充填したもの	目的
診断	ガンマ線放射体	リンパ節シンチグラフィー
	抗酸性	
	T 1 剤	リンパ組織MRI検査法
	T 2 剤	リンパ組織MR四象法
	放射線不透過性の剤	リンパ組織CTスキャン
	結合性散乱剤	リンパ組織超音波検査
治療	ベータまたはアルファ線放射体	LN転移放射線法
	免疫調節物質	LN転移予防治療
		全身の免疫調節
		活性化マクロファージにより感染リンパ球の根絶
	抗新剤	LN転移化学療法
	抗原	免疫抑制

担体の収容力および生体分布

血液からリンパ節に移動させられる炭水化物連結ポリマーの待機の薬物動態は、該管内リンパ親和性の診断物質および治療物質の開発のための担体としてそれらの使用を可能にする。

本免の担体はそれらの（1）内部コア（たとえばポリシン）が多量の診断用標識または生物活性のある化合物で充填されているので大きな収容力を有する可能性、そして（2）組みの剤を含み、そして選択する能力により特徴づけられる。この免の実施例は広範囲の剤【たとえば、放射性技術、T 1（ガドリニウム）およびT 2（超常磁性酸化鉄）、NMR造影剤、および有機の分子（DTPA、ロードミンX）を担体の内部コアに結合するか、または担体の内部コアと

して用いる（実施例5、6、7、8、13参照）。

薬局の部位において、剤の作用は担体へのその付着の方法に依存する。したがって、剤と担体の結合は、効率的な剤の作用を提供するように選択される。診断剤の大部分（たとえば、放射性技術およびNMRおよびX線造影剤）およびいくつかの治療剤（たとえば、酵素）は担体に連結されながら、それらの目的を達成する。しかしながら、大部分の生物活性のある剤または治療剤は担体から放出され、したがってそれらは選択した、未結合状態で機能する、したがって、担体の化学構造は、それが担体の特性を失うことなしに剤と担体の間の異なる化学結合の使用を可能にする場合、最適と考えられる。実施例2および4は、腫瘍の官能およびスペーサー分子がポリマー構造に組み込まれることを示す。

グラクトした剤を育するこの免の炭水化物グラフト担体の生体分布は、剤を行きない炭水化物グラフト担体のそれと類似することが期待される。担体の生体分布への剤の影響を推測するために、ロードミンX（R h X：分子量=584D）を有機分子の剤として選択した。多量のR h X分子を担体のポリリシンコアに固定し（実施例8）、担体用高分子複合体の構造を観察した。この複合体の生体分布をシンチグラフィーおよび従来方法により研究し、R h Xを含まない担体の生物分布と類似していることを示している。表2および図9と9bは生体分布の例を示す。

表2 ロードミンX充填デキストラン連結ポリシンの生体分布の典型的な例

組織	皮膚体蓄積	
	%重量/g組織	%
リンパ節		
大動脈筋	113.40	
臍周筋	34.10	
胸部	19.30	
膝窩	41.30	
頸部	2.00	
脾臓	20.30	
肝臓	1.50	
筋肉	0.02	

実験的炎症モデルにおける炭水化物グラフト担体の作用

炭水化物グラフト複合物のリンパ節における蓄積は、周囲の組織の状態に依存する。実施例7に従い調製された複合物を用いる実験において（実施例19参照）、採取に及ぼす炎症の作用を研究した。急性炎は、最も近い局所のリンパ節における複合物採取の増大を生じることが見出された（図10a参照）。この実験において、複合物は炎症の領域にも蓄積することが示された。炎症の結果が、右回転に増殖する癌のラットの実験において得られた（実施例20および図20a参照）。この実験において、癌領域に採取している筋において過温症が組織学的方法により見出された。これは、リンパ節における複合物の蓄積の増大を説明する。

炎症部位における担体蓄積のメカニズムは、リンパ節におけるそれとおそらく類

特表平7-509467 (11)

実施例2 デキストラングラフトジエチレントリアミン五酢酸(DTPA) 落葉 ポリレリシンの合成

実施例1からのデキストラングラフトポリレリシン1mgを0.1Mホウ酸ナトリウム0.1mlに溶解し、溶液を水浴で冷却する。DTPA環化無水物5mgをジメチルスルホキシド(DMSO)0.1mlに溶解する。DTPA環化無水物溶液を4°Cのデキストラングラフトポリレリシン溶液に加え、激烈に搅拌する。続いて、4°Cで12時間インキュベートする。セファデックスG-100または類似のゲルを充填した、10×1cmまたは類似物のゲルクロマトグラフィーカラム、そして溶離液として0.9%NaClを用いて、生成物を分離する。生成物を固結乾燥するかまたは溶液の状態で貯蔵する。

実施例3 デキストラングラフト[N-ヒドロキシスクシンイミド・ビス・ジチオブロピオニル]ポリレリシンの合成

実施例1からのデキストラングラフトポリレリシン1mgおよびトリエチアルミン0.01mlをDMSO 0.1mlに溶解する。(ジオ・ビス・ジブロピオニル)ジN-ヒドロキシスクシンイミド5mgをDMSO 0.1mlに溶解する。(ジオ・ビス・ジブロピオニル)ジN-ヒドロキシスクシンイミド溶液をデキストラングラフトポリレリシン溶液に加え、激烈に搅拌する。続いて、20°Cで1時間インキュベートする。セファデックスG-25または類似のゲルを充填した、10×1cmまたは類似物のゲルクロマトグラフィーカラム、そして溶離液としてDMSOを用いて生成物を分離する。生成物を固結乾燥するかまたは-20°Cの液体窒素中で貯蔵する。

この組合はアミノ化合物の直接結合のために用いられる。

実施例4 デキストラングラフト[ヨーメルカブトブロピオニル]ポリレリシンの合成

実施例3からのデキストラングラフト[N-ヒドロキシスクシンイミド(ビス・ジチオブロピオニル)]ポリレリシン1mgを0.1Mクエン酸ナトリウム溶液0.1mlに溶解する。37°Cで1時間インキュベートする。ジオエリトリ

似している。蛍光顯微鏡およびオートラジオグラフィーを用いて、癌の部位での蓄積は、癌組織の中よりもむしろ主に散乱細胞(被炎されたマクロファージ)中の折取によるものであった。炎症部位における腫瘍の透過性の増大も蓄積に寄与している。癌組織1グラムに付き蓄積される製剤物の量は、正常および癌組織のリンパ節組織の1グラムに付き蓄積される量より著しく少なかった。したがって、本発明は、特にリンパ転移の診断、予防および治療、転移およびリンパ節の悪性度の鑑別に有用であると予想される。

実施例

実施例1 デキストラングラフトポリレリシンの合成

水5mlにデキストラン(MW 10kD)2gを溶解し、水1.5mlに過ヨウ素酸ナトリウム0.4gを溶解する。デキストラン溶液と過ヨウ素酸ナトリウム溶液を混合し、室温で1時間または攪拌下4°Cで12時間インキュベートする。続いて、反応混合液に200mlになるまで水を加え希釈する。YM3膜を備えた限外濾過アミコンセル(Amicon cell)を用いて、溶液を5mlに濃縮する。希釈と濃縮の段階を繰り返し、反応液の低分子量生成物を取り除く。続いて、ポリレリシン(MW 70kD)20mgをクエン酸ナトリウム緩衝液(0.1M, pH 8.3)2mlに溶解する。溶解された環化デキストラングラフトポリレリシン溶液を激しい搅拌下で混合する。搅拌下で20分インキュベートする。水素化シアノホウ酸ナトリウム20mgを1mlに溶解し、反応混合液に加える。反応混合液を室温で24時間搅拌する。反応混合液に200mlになるまで水を加えて希釈し、続いて、YM100膜を備えた限外濾過アミコンセルを用いて溶液を5mlまで濃縮する。希釈と濃縮の段階を、合計でそれぞれ3回行う。続いて、生成物を溶液乾燥するか、または0.1Mクエン酸ナトリウム0.1mlを加え、溶液の状態で貯蔵する。

デキストラングラフトポリレリシンを、実施例2-4のように、内部のポリマー(ポリレリシン)のアミノ基へのキレート基または他の活の付着により修飾する。

トール10μlを加え搅拌する。続いて、37°Cで1時間インキュベートする。セファデックスG-100または類似のゲルを充填した、10×1cmまたは類似物のゲルクロマトグラフィーカラム、そして溶離液として0.9%NaClを用いて生成物を分離する。-20°Cの液体窒素中で貯蔵する。

この組合はSH基含有化合物の直接結合のために、およびスルフィド基と対して高親和性を有する金属イオンの選択性のために用いる。

実施例5-9は放射性核種およびT1磁気共鳴造影剤で標識されたポリマー剤である。DTPAキレート化の最適pH範囲と水和イオン(1n³およびGd³⁺)の安定性の最適pH範囲の不適合性のために、標識化はリガンド交換により行われる。

実施例5 デキストラングラフトポリレリシン[Gd³⁺-DTPA]

0.04M HCl中の¹¹¹InCl₃(1mCi)溶液を5倍容積の0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液pH 5.3-5.5(または市販のインジウム-111クエン酸溶液を用いる)と混合する。実施例2のようにポリレリシン[DTPA]デキストラン100mgを0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液0.1ml, pH 5.3-5.5に溶解する。溶液を混合し、室温で30分間インキュベートする。インキュベーション後、必要ならば、GdCl₃1mgを加えて残存しているDTPA基を不活性化する。標識をゲルクロマトグラフィー(セファデックスG-25、溶離液として0.9%NaCl)により0.9%NaClと置換する。

実施例6 デキストラングラフトポリレリシン[Gd-DTPA]

0.3Mクエン酸ナトリウム緩衝液pH 5.3-5.5中に10mg/mlのGdCl₃・6H₂O溶液を調製する。実施例2のように、ポリレリシン[DTPA]デキストラン10mgを水0.1mlに溶解する。GdCl₃・6H₂O溶液を混合し、室温で30分間インキュベートする。標識をゲルクロマトグラフィー(セファデックスG-25、溶離液として0.9%NaCl)により0.9%NaClと置換する。

実施例7 デキストラングラフトポリレリシン[Gd³⁺-¹¹¹In-DTPA] [フルオレセイン]

実施例1のように、ポリレリシンデキストランを調製し、1mgを0.1Mホウ酸ナトリウム(pH 9.3)1mlに加える。DMSO 100μl中に0.2mgのフルオレセインイソチオシアート溶液を調製する。フルオレセインイソチオシアート溶液を激しい搅拌下でポリレリシンデキストラン溶液に注入する。室温で30分間インキュベートする。DTPA環化無水物5mgをDMSO 0.1mlに溶解する。DTPA環化無水物溶液をポリレリシン[フルオレセイン]デキストラン溶液に加え、激烈に搅拌する。続いて、4°Cで12時間インキュベートする。セファデックスG-100または類似のゲルを充填した、10×1cmまたは類似物のゲルクロマトグラフィーカラム、そして溶離液としてDMSOを用いて生成物を分離する。0.04M HCl中の¹¹¹InCl₃(1mCi)溶液を5倍容積の0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液pH 5.3-5.5(または市販のインジウム-111クエン酸ナトリウム溶液を用いる)と混合する。ポリレリシン[DTPA-フルオレセイン]デキストランと¹¹¹InCl₃・HCl・クエン酸ナトリウム溶液を混合し、室温で30分間インキュベートする。0.3Mクエン酸ナトリウム緩衝液、pH 5.3-5.5中に10mg/mlのGdCl₃・6H₂O溶液を調製する。GdCl₃・6H₂O溶液を混合し、室温で60分間インキュベートする。ゲルクロマトグラフィー(セファデックスG-25、溶離液として0.9%NaCl)により生成物を分離する。

実施例8 ロードミンX(RhX)を充填されキレート基(DTPA)で標識されたデキストラングラフトポリレリシンの合成

ポリレリシン純化水物(MW 40kD Sigma)10mgを0.1Mホウ酸ナトリウム(pH 9.3)1mlに溶解する。DTPA環化無水物(Picer)4mgをDMSO 50μlに溶解し、冷却した(5°C)ポリレリシン溶液に搅拌下で加える。ロードミンXイソチオシアート(分子プローブ)3.

特表平7-509467 (12)

0 mgをDMSO 20 μlに溶解し、反応混合液に加える。得られた溶液を室温で2時間インキュベートする。生成物ポリレリシン (RhX) (DTPA) をセファデックスG-25 (Pharmacia) のゲルクロマトグラフィーにより精製する。

デキストラン1 g (MW 10 kD, Pharmacia) を水5 mlに溶解し、NaIO₄ 溶液2 ml、100 mg/mlのH₂O₂と混合する。1時間のインキュベーションの後、反応混合液に100 mlになるまで水を加えて希釈し、続いて、塩を取り除くためにアミコンYM3膜を用いて5 mlに濃縮する。希釈と濃縮の段階を、それぞれ合計3回行う。

脱水デキストランの溶液をポリレリシン [RhX] [DTPA] 溶液と混合し、続いて、U. 1Mクエン酸ナトリウム (pH 8. 3) 中の水素化シアノホウ素ナトリウム溶液 (1 mg/ml) 50 mlと混合する。反応混合液を室温で24時間搅拌する。アミコンXM50膜を用いてデキストラングラフトポリマーを分離し、ゲルクロマトグラフィー (セファデックスG-100) により精製し、精製乾燥する。

上記の合成方法はデキストランで鎖作用にグラフトされるポリマー組成物ポリレリシン [RhX] [DTPA] を得るために開発された。生成物は、ポリリシン1分子に付きデキストラン24分子 (平均であり、PLのMW=40 kDおよびデキストランのMW=10 kDと仮定する) 4% (w/w) のロードミンX (全陰イオンの吸収率0. 15 μg/mg) を含んでいた。

実施例9 分枝ポリレリシンコアポリマー

100 mgのポリ (ε-N-カルボベンゾキシ (CBZ)) リシン (MW=10 kD) をDMSO 2 mlに溶解する。クエン酸ナトリウム0. 1 mgを加え搅拌する。ジクロヘキシカルボジイミド2 mgを加え、搅拌し、10分間インキュベートする。ポリレリシン (MW=10 kD) 10 mgをDMSO 100 μlに溶解し、反応混合液に加える。搅拌下で24時間インキュベートする。沈殿物を遠心により取り除く。生成物を精製乾燥する。HBr/脂肪試薬5 mlを加え、搅拌する。密閉したチューブ中で1時間インキュベートする。沈殿物を分離する。

非常に激しい搅拌下で、0. 04 M HCl中の¹¹¹InCl₃ 溶液50 μlを群母B-グルカンフルオレセイン溶液 (0. 5 mg/ml) 0. 5 mlに注入し、続いて30%アンモニア5 mlを加える。生成物を70°Cで30分間インキュベートする。ゲルクロマトグラフィー (セファデックスG-100) そして溶離液として0. 9%NaCl) を用いて生成物を分離する。

実施例13 デキストランにより開発にグラフトされた超選択性脱水化鉄粒子

デキストラン (MW 10 kD) 1. 55 gを水3 mlに溶解する。溶液を室温で30分間搅拌する。デキストラン溶液中でFeCl₃ · 6H₂O 0. 105 gとFeCl₂ · 4H₂O 0. 039 gを溶解し、得られた溶液を4°Cまで冷却する。溶液のpHが10. 5に増加するまで非常に激しい搅拌下で30%アンモニア溶液を1滴ずつ徐々に加える。続いて、搅拌下で生成物を70°Cで45分間インキュベートし、紫外線過 (YM300膜) またはゲルクロマトグラフィー (セファローズ CL2Bまたはセファクリル S300) を用いて生成物を分離する。

実施例14 脱水化鉄フィコールグラフト粒子

フィコール (スクリースの合成ポリマーの商標名: MW 40 kD) 20 gを水20 mlに溶解し、溶液を室温で30分間搅拌する。フィコールの溶液中にFeCl₃ · 6H₂O 0. 1 gを溶解し、得られた溶液を4°Cまで冷却する。溶液のpHが10-10. 5に増加するまで非常に激しい搅拌下で30%アンモニア溶液を1滴ずつ徐々に加える。搅拌下で生成物を70°Cで30分間インキュベートする。紫外線過 (YM300膜) またはゲルクロマトグラフィー (セファローズ CL2Bまたはセファクリル S300) を用いて生成物を分離する。

上記実施例は、この発明に従い空間的に保護される凝物母体を調製するため的一般的で特徴的指針を示すが、当発明者は、さらに別の候補分子を組み立て、それらの特徴を本発明により特許請求されている分子と比較できる。

動物実験

接着、ドライエーテル5 mlで少なくとも4回ほど洗浄する。

分枝ポリレリシン臭化水素は実施例1-8のものと類似の合成におけるコアポリマーとして使用できる。

実施例10 デキストランポリレリシン分子 "骨格"

デキストラン (MW=10 kD) 1 mgを水0. 2 mlに溶解する。過ヨウ酸カリウム0. 5 mgを水0. 1 mlに溶解し、溶液を混合する。搅拌し、室温で1時間インキュベートする。20 mgのポリレリシン (MW=10 kD) 溶液を0. 1 Mホウ素ナトリウム (pH 9. 3) 1 ml中で調製する。脱水デキストランとポリレリシン溶液を混合する。搅拌下で20分間インキュベートする。3 mgの水素化シアノホウ素ナトリウム溶液を水0. 5 ml中で調製し、反応混合液に加える。搅拌し12時間インキュベートする。ゲルクロマトグラフィー (セファデックスG-100) により生成物を精製し、凍結乾燥する。

ポリレリシンデキストラン複合体は実施例1-8のものと類似の合成におけるコア "骨格" ポリマーとして使用できる。

実施例11 1n標識された (最小合成) 脱水化鉄III β-グルカングラフト粒子

群母B-グルカン2 mgを水5 mlに溶解する。FeCl₃ · 6H₂O 2 mgを水10 μlに溶解する。栓を開いた、小さな (1 ml) ポリプロピレン遮光チューブ中でB-グルカン溶液とFeCl₃ · 6H₂O溶液1 μlを混合する。¹¹¹InCl₃ 溶液1 mlを加える。栓とNH₃ 溶液で起らされたクロマトグラフィー紙の小さな一片を、このチューブの上部に置く (NH₃ 溶液を反応混合液に落としてはならない。また紙は溶液に接触してはならない。NH₃ をガス相により反応混合液に移動する)。チューブを閉じて70°Cの湯槽に30分間入れる。セファデックスG-100または類似のゲルを充填した、10 × 1 cmまたは類似のゲルクロマトグラフィーカラム、そして溶離液として0. 9%NaClを用いて生成物を分離する。

実施例12 木質化インジウムB-グルカン [フルオレセイン]

実施例15 ラットおよびウサギシングルグラフィー

スプラーグ・ドレイ (Sprague Dawley) ラット (250-300 g) 22匹およびホワイトニュージーランド (white New Zealand) ウサギ (2-2. 5 kg) 4匹に動物実験を行った。動物をペントバルビタール (ラット) または塩酸ケタミン (ウサギ) で麻酔した。放射標識したポリマー (実施例1および5にしたがって調製された) 1 mg/kg (0. 3-1 mCi/kg) を尾の静脈に注射した。調製物の生体運動学を動的シングルグラフィーにより研究した。静的断面を注射24時間後に得た。結果を図4-a-4-cに示す。

実施例16 ポリマーおよびコロイドデキストラングラフト調製物の生体分布

スプラーグ・ドレイラット (250-300 g) 16匹に動物実験を行った。動物をペントバルビタールで麻酔した。放射標識したポリマー (実施例8に従い調製) または粒子 (煮熟肉13に従い調製) 1 mg/kg (0. 1-1 mCi/kg) を尾の静脈に注射した。注射の正確性をシングルグラフィーにより管理した。動物の組織に放射能を示す動物は、炎焼から除外された。動物を殺性にし、注射24時間後、生体分布の研究のために組織を採取した。結果を図5-a (ポリマーを主成分とする) そして5-b (粒子を主成分とする) に示す。

実施例17 リンパ節組織における蛍光、放射性標識調製物の最小分布

スプラーグ・ドレイラット (250-300 g) 6匹に動物実験を行った。動物をペントバルビタールで麻酔した。放射標識した蛍光ポリマー (実施例7に従い調製) 1 mg/kg (0. 1 mCi/kg) を尾の静脈に注射した。注射および生体分布の正確性をシングルグラフィーにより管理した。動物を殺性にし、注射24時間後、最小分布の研究のために組織を採取した。リンパ節組織を剥離し、5-7 μm切片を固定せずに調製した。蛍光頭蓋鏡検査はZeiss Axiovert 35顕微鏡を用いて行った。蛍光物質の蓄積は頭蓋鏡の領域に位置する細胞 (主としてマクロファージと同定される) また洞内面を囲う細胞に、最も

頭部であった。皮質傍の散乱細胞、小胞周囲の細胞および小胞内マクロファージも顕著な量の蛍光物質を蓄積した。調製物の典型的な微小分布を図7に示す。

実施例18 投与24時間後および37日後の調製物の微小分布比較

動物実験をスプーラー・ドーレイラット(350g)2匹行った。動物をペントバルビタールで麻酔した。放射標識の超常活性化鉄粒子、1kgに付き鉄50μm(実施例13に従い調製)を尾の静脈経由で投与し、24時間後、それらの生体分布をマシンチグラフィーにより管理した。放射標識蛍光ポリマー(実施例13に従い調製)1mg/kg(0.3mCi/kg)を酸化鉄粒子の注射37日後、同じ動物の尾の静脈経由で注射した。注射および生体分布の正確性をマシンチグラフィーにより管理した。動物を犠牲にし、注射24時間後、微小分布の研究のために組織を採取した。リンパ節組織を凍結し、5-7mm切片を固定せずに調製した。蛍光標識換氫をZeiss Axiovert 35顕微鏡を用いて行った。蛍光物質の蓄積は実施例17に記載されたそれと類似であることが見出された。軟伏巣(正常のラットには存在しない)が脛骨と皮質物の主に筋肉毛細血管周囲の領域に形成された。蓄積の位置は蛍光標識のものと samaなっていた。酸化鉄粒子およびローダミンX標識ポリマー調製物の投与後の同じマシンチグラフィーの蛍光頭微鏡写真および透過光頭微鏡写真(図8a参照)を示す。

実施例19 誘発した炎症を有する動物における炭水化物グラフトポリマーリシン分布の研究

ホワイトニュージーランドウサギ(3-3.2kg)4匹に動物実験を行った。以前記載されているように、細菌 1×10^9 を有するスタヒロコッカス・アウェウス感染液の注射により脚の組織に急性炎を誘発した。実施例7に従い調製した調製物を、注射後3日目に投与した。動物を縫合ケタミンで麻酔した。放射標識のポリマー1mg/kg(0.3mCi/kg)を耳の静脈に注射した。筋的西像を注射48時間後に得た。結果を尾の頭部の前面像として図10aに示す。

実施例20 誘発された乳腺癌を有する動物における炭水化物グラフトポリマリ

ポリマーは、液状状態または溶液状態でクエン酸鉄街液組成物と組み合わせて用いる。必要なならば、種々の放射性核種での標識のためにDTPA基を他のキレート基で置換する。

超音波溶融前もって調製し、固体の組成物としまたは溶液として貯蔵する。いくつかの通常のために、著しく技術を変えることなく異なるT1およびT2の弛緩活性を有する他の超活性金属イオンによりガドリニウムを置換する。

ターゲット指向の生物活性のある化合物は、上記実施例のものに近い技術を用いて、診断用調製物のために調製される。使用される例がある条件で不安定である場合、医薬剤の最適化は、特に、生物活性のある剤の貯蔵の必要条件に依存する。一般に、安定性と物理的性質を有する(たとえば溶解を促進する)添加剤を有する、液体状態の炭水化物連結ポリマーおよび酸粒子の生成のための障害はない。

本発明の診断および治療用物質は次の特質の1以上を有する。物質を動物(たとえばラットまたはウサギ)に動物の1kgの体重に付き1mgの用量で尾静脈に注射する場合、リンパ節組織の1gに付き物質の投与された用量の少なくとも50%がリンパ節に蓄積するようにターゲット指向部位が担体に分布している。物質を1mMのクエン酸ナトリウムを含むラット血液の血漿に37℃で2時間さらす場合、物質に吸収されるタンパク質の80%以上がC3か、または自然に存在するその変異型であるようにターゲット指向部位が物質に分布している。1mMのクエン酸ナトリウムを含むラットの血液に37℃で2時間さらす場合、物質が血液の血漿タンパク質において、その量の50%以下を吸収するようにターゲット指向部位が物質に分布している。物質を1mMのクエン酸ナトリウムを含むラットの血漿に37℃で2時間さらす場合、物質に吸収されるタンパク質の80%以上がC3か、または自然に存在するその変異型であり、物質が血液の血漿タンパク質において、その量の50%以下を吸収するように前記ターゲット指向部位が物質に分布している。そして(担体または剤が血を含む実施例において)物質を1mMのクエン酸ナトリウムを含むラットの血漿に37℃で2時間さらす場合、物質が、前記物質の1位子に付く1分子以下の移転と結合するようにターゲット指向部位が物質に分布している。0.9%NaCl水溶液中の物質の0.

シン分布の研究

フィッシャーラット(200-250g)24匹に動物実験を行った。肩右脚の乳腺癌を 10^7-10^8 R3230AC細胞(マサチューセッツ州 Hopkinton市 Biomeasureから得た)の皮下移植により誘発した。実施例7に従い調製された調製物を、移植後10日目に投与した。動物をペントバルビタールで麻酔した。放射標識されたボリマー-1mg/kg(0.3mCi/kg)を尾の静脈に注射した。筋的西像を注射24時間後に得た。結果を、頭部の頭頸部の前面像として図10bに示す。

実施例21 磁気共振測定のための炭水化物グラフト担体の適用

実施例8に従い調製した担体を実施例7に記載しているようにIII¹uで標識し、ガドリニウムを充填した。調製物を、実施例16に記載されているように、1kgの体重に付き15μmのGdの濃度でラット5匹に投与した。肩間筋リンパ節を投与24時間後には取り、ひとつの試料チューブにプールした。リンパ節の弛緩時間T1を37℃で測定し、巡回回数ペリス配列を用いて0.47Tであった。肩間筋リンパ節の弛緩時間は、対照群のラット5匹の4.76msに比較し1.54msに減少することが見出された。

用法

本発明の物質は、一般に、体重1キログラムに付き2グラム以下の用量で、好ましくは体重1キログラムに付き0.5マイクログラム-50ミリグラムの用量で投与される。

他の実施態様

他の実施態様は下記の特許の請求の範囲であり、たとえば、担体を基礎にした調製物は、貯蔵条件のための例外的な必要条件なしに便利な医薬剤として生成される。

†画像のための診断用調製物は、注射直前に標識のために調製された非放射性キットとして製剤化されている。したがって、本発明の実施例2に従い調製された

0.1-1.0mg/mlの混合物が、物質を溶液に加えた後、37℃でインキュベートした場合、インキュベーションの初めの24時間中には凝聚または沈殿しない。0.9%NaCl水溶液中の物質の0.01-1.0mg/mlの混合物は、物質を前記溶液に加えた後、均一の磁場0.47テスラで37℃でインキュベートした場合、インキュベーションの初めの72時間中には凝聚または沈殿しない。

これらは特性は、物質が、たとえば下記のプロトコールを用いる本発明での用途に適切かどうかを決定するために用いられる。フィブリル形成を防ぐために最小量、たとえば1mMのクエン酸ナトリウムを含む完全無菌の正常なラット血液の血漿を調製する。前記血漿中に問題の担体(または物質)を37℃で2時間インキュベートする。前記担体または物質を、たとえば超遠心により血漿から分離する。問題の担体または物質へのタンパク質結合と本発明の担体(たとえば実施例2または13に従い調製)のそれを、たとえば、電気泳動およびイムノプロットにより比較する。本発明の担体は、C3および自然に存在するその変異型および断片に主に結合するが、他の担体、たとえば酸化鉄粒子は顕著な量の(たとえば結合したC3に対して10-1500% w/w)トランスフェリン、免疫グロブリンまたは他のタンパク質に結合する。

無機物において(たとえば鉄含有粒子)、トランスフェリンの結合は、診断および生物活性または治療の物質または担体において、さらされて保護されていない粒子表面の存在、または望ましくない種類の金属(たとえば鉄)化合物の存在を示す。本発明の鉄含有物質および担体は、上記条件下で1位子に付く1トランスフェリン以上結合しない。

免疫グロブリンおよび他のタンパク質の結合は、保護されていない粒子表面のタンパク質の非特異的吸着、ならびに担体または物質構造における(たとえばターゲット指向部位における)望ましくない成分の存在、たとえば物質合成の過程において変化した炭水化物分子の存在を示す。他のタンパク質の存在は、タンパク質の非特異的吸着、または本発明の担体または物質とのタンパク質の非特異的または特異的相互作用を示す。トランスフェリン、免疫グロブリンおよび他のタンパク質の場合は肝臓、骨、骨髄、脾臓および他の臓器における担体の認識を示す。

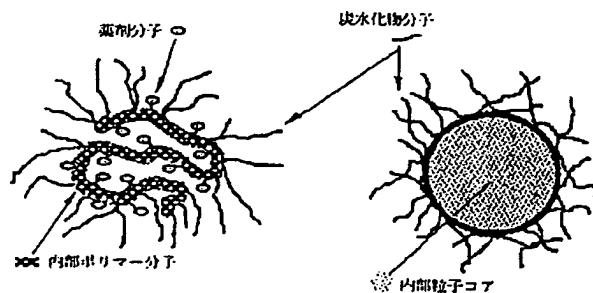
加させ、リンパ節における担体の蓄積を減少させる。

これらの方法は、それらの製造方法の特質のパラメーターを最適にするためにも使用される。

我々はこの発明の保護された製型物の選択性および不活性に関していかなる重大な問題も予想していない。たとえば、我々のモデル製型物の合成のために用いられる出発物質は、基本的に生体分解可能であり、それらは滅菌の、非発熱性状態で得られる。さらに、最終の製型物は滅菌、γ照射およびオートクレーブにより滅菌される。

Figure_1a

Figure_1b



Figure_2

Figure_3

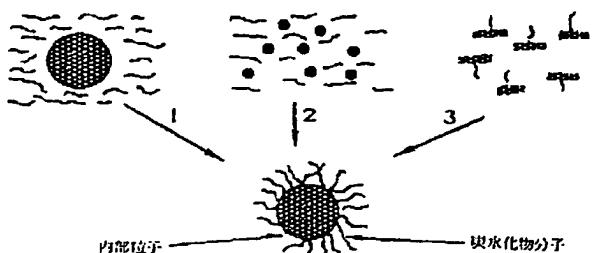
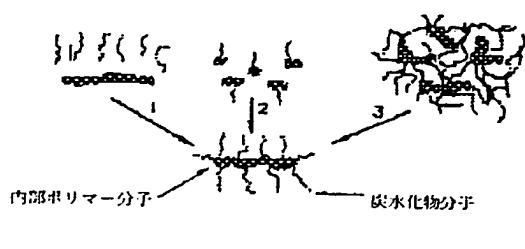


Figure 4a

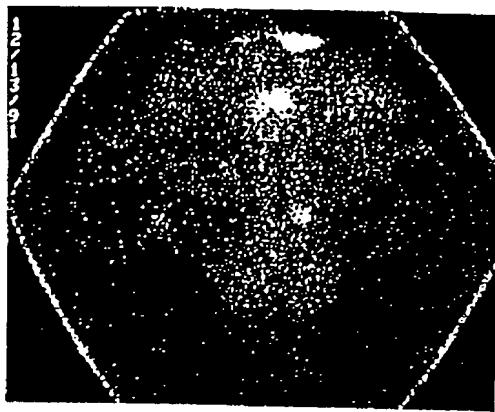


Figure 4b

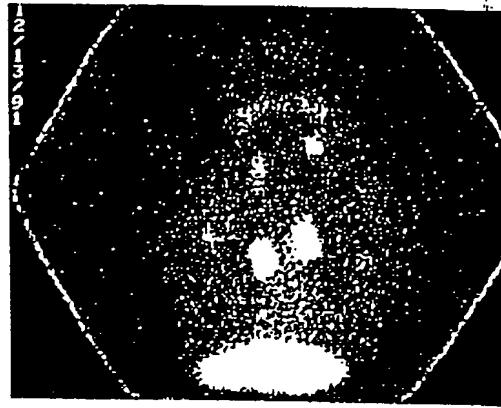


Figure 4c

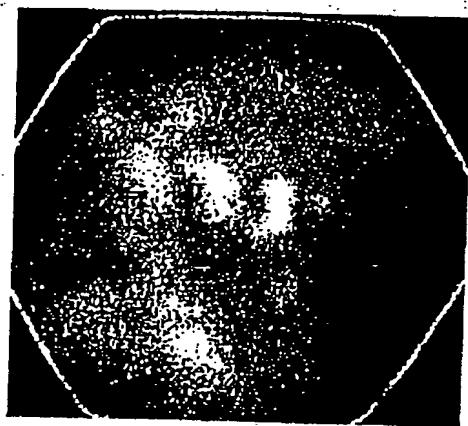


Figure 5a

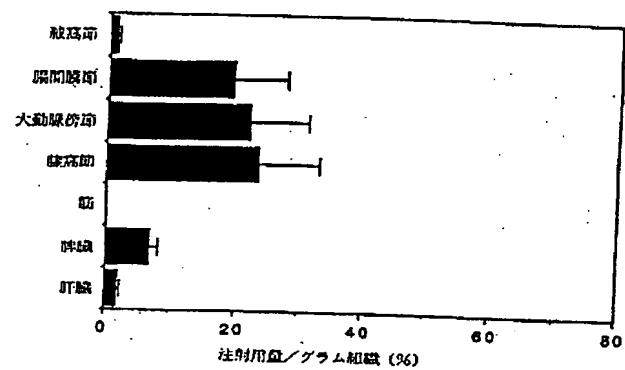


Figure 5b

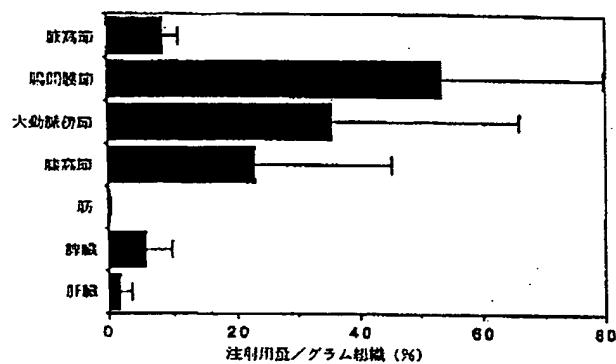


Figure 6

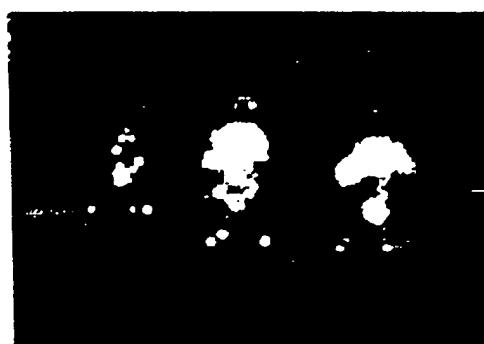


Figure 7

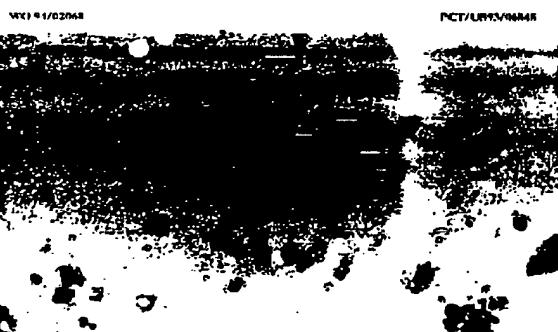


FIG. 8A



FIG. 8B

Figure 9a



Figure 9b

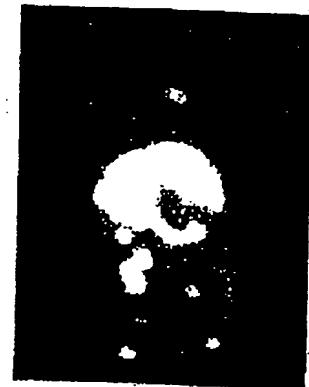
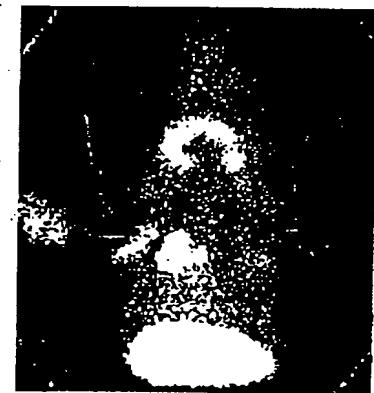


Figure 10a



Figure 10b



国際検索報告		International Application No. PCT/2007/00046															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPCN: A61B 38/00; A 61 K 1/00, A 61 M 3/00 US CL: 1284312, 659, A, 4361, 1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Maximum documentable search classification system followed by relevant symbols U.S. : 1284312, A61A, 659, 900; 4361, 1 Documentable search field other than maximum documentation is the extent that such documents are contained in the fields recorded																	
Structure data were recorded during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, CATALOG																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; width: 10%;">Category</th> <th style="text-align: left; width: 80%;">Claims of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage</th> <th style="text-align: left; width: 10%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US, A, 4,827,848 [GROMAN ET AL.] 09 MAY 1989, see column 1, lines 1-10; column 4, lines 1-60; column 6, lines 5-10; column 7, lines 30-55; and column 20, lines 28-30</td> <td>1-31, 34-39, 43-53, 55-64</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US, A, 4,310,805 [BALDENSCHWEILER ET AL.] 12 JAN 1982, teaching the use of physiologically acceptable radioactive tracer elements and cell receptor antagonists. See entire document.</td> <td>32, 33, 40-42, 54</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US, A, 4,988,233 [KLAIVENESS ET AL.] 15 JAN 1991</td> <td>ALL</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US, A, 4,735,210 [GOLDENBERG] 06 APR 1988, see entire disclosure</td> <td>ALL</td> </tr> </tbody> </table>			Category	Claims of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.	X	US, A, 4,827,848 [GROMAN ET AL.] 09 MAY 1989, see column 1, lines 1-10; column 4, lines 1-60; column 6, lines 5-10; column 7, lines 30-55; and column 20, lines 28-30	1-31, 34-39, 43-53, 55-64	Y	US, A, 4,310,805 [BALDENSCHWEILER ET AL.] 12 JAN 1982, teaching the use of physiologically acceptable radioactive tracer elements and cell receptor antagonists. See entire document.	32, 33, 40-42, 54	A	US, A, 4,988,233 [KLAIVENESS ET AL.] 15 JAN 1991	ALL	A	US, A, 4,735,210 [GOLDENBERG] 06 APR 1988, see entire disclosure	ALL
Category	Claims of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.															
X	US, A, 4,827,848 [GROMAN ET AL.] 09 MAY 1989, see column 1, lines 1-10; column 4, lines 1-60; column 6, lines 5-10; column 7, lines 30-55; and column 20, lines 28-30	1-31, 34-39, 43-53, 55-64															
Y	US, A, 4,310,805 [BALDENSCHWEILER ET AL.] 12 JAN 1982, teaching the use of physiologically acceptable radioactive tracer elements and cell receptor antagonists. See entire document.	32, 33, 40-42, 54															
A	US, A, 4,988,233 [KLAIVENESS ET AL.] 15 JAN 1991	ALL															
A	US, A, 4,735,210 [GOLDENBERG] 06 APR 1988, see entire disclosure	ALL															
<input checked="" type="checkbox"/> Priority documents are listed in the declaration of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family section.																	
Approval authority of each document																	
A Document which the examination of the case which it is enclosed *B* Document published after the international filing date of the present application and before the international publication date of the present application, which is not intended for disclosure in the present application																	
C Document published after the international filing date of the present application and before the international publication date of the present application, which is not intended for disclosure in the present application, but which is intended for disclosure in other cases																	
D Document published after the international filing date of the present application and before the international publication date of the present application, which is not intended for disclosure in the present application, but which is intended for disclosure in other cases																	
E Document which is not intended for disclosure in the present application																	
Date of the earliest completion of the international search		29/08/1993															
Name and mailing address of the ISA/US For PCT Washington, D.C. 20530 Patent No. NOT APPLICABLE		Authorised officer SWALIN SMITH Telephone No. (703) 308-2010															
Form PCT/ISA/210 (version 03 of patentability 1992)																	

フロントページの続き

(51) Int. Cl. *

A 61 K 49/00
51/00

識別記号

C 9051-4C

F I

9051-4C

C

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE,
 DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
 C, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG
 , CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,
 TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, BY,
 CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, H
 U, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, MG, MN
 , MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU,
 SD, SE, SK, UA, VN

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)